

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Applicant's Copy

88040V/51 NIPPON SINYAKU CO LTD	B04	NIPS 28.12.70 J7 4043-937	B4-C2, B12-H3.	2	82
28 12 70-JA-126756 (25.11.74) A61k-27 C07c-141 C08b 19.02 Depolymerised pectin sulphate prodn. - for use in long-term treatment of hypocholesterolaemia			polymn. 10.4). This product (3g) was added to chlorosulphonic acid (3 ml.) in formamide (30 ml.), and the mixture stirred at room temperature for 24 hours. NaCl in methanol was added. The ppt. was separated and dissolved in a little water. The solution was neutralised with NaOH, and methanol added to a methanol concn. of 90%. The ppt. was dried to give the Na salt of depolymerised pectin sulphate (4.7g).		
<p>Method for the production of depolymerised pectin sulphate, comprises depolymerisation of commercial pectin in 10-60% aqueous lower alkanol (e.g. methanol, ethanol) or glycerol, contg. KOH or NaOH approximately equimolar with the carboxyl groups present in the pectin. The concn. of pectin is pref. 2-10%, and the reaction is carried out at from 40°C to reflux. At the beginning of the reaction the pH is 12-13; at the end about 7. The depolymerised pectin is separated (e.g. by salting-out) and then sulphonated (e.g. using chlorosulphonic acid in a solvent such as DMF, formamide, pyridine).</p>					
<p><u>USE</u> Long-term treatment of hypercholesterolaemia; no anti-coagulant activity.</p>					
<p><u>EXAMPLE</u> NaOH (0.5g), water (160 ml.) and methanol (40 ml.) were treated with commercial pectin (5.0g) at 60°C and stirred for one hour. 5M NaCl was added (22 ml.) together with methanol (1600 ml.). The ppt. was dried (4.2g) (degree of</p>					
88040V					

514-54

⑤ Int. Cl.

⑤ 日本分類

⑨ 日本国特許庁

⑩ 特許出願公告

C 08 b 19/02

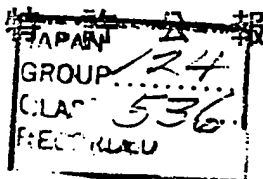
16 B 72

A 61 k 27/00

26(1) B 21

C 07 c 141/00

30 B 0



昭49-43937

④ 公告 昭和49年(1974)11月25日

発明の数 1

(全5頁)

1

⑥ 低分子ペクチン硫酸の製造法

② 特 願 昭45-126756

② 出 願 昭45(1970)12月28日

③ 発 明 者 村山正雄

京都市中京区壬生馬場町16

同 榎本宏

京都府乙訓郡大山崎町円明寺脇山
1の110

同 吉国悦明

京都市南区唐橋花園46

同 倉舩平

京都府乙訓郡長岡町字開田小字朝
日園1日本新薬長岡寮内

⑦ 出 願 人 日本新薬株式会社

京都市南区吉祥院西の庄門口町
14

⑧ 代 理 人 弁理士 片岡宏

図面の簡単な説明

第1図は本発明の低分子ペクチン硫酸の消化管
吸収データを示す。

発明の詳細な説明

本発明はリボプロテインリパーゼ活性化用を有し、高脂血症治療薬として有効な低分子ペクチン硫酸の製法に関するものである。

脳血管障害あるいは冠動脈疾患による死亡は近年ますます増加の傾向をたどっており、このような動脈硬化が原因となつて起る疾患に対する対策の重要性が高まつている。

動脈硬化の成因については多年にわたる、かつ色んな角度からの研究にもかかわらず、その詳細はいぜんとして不明であり、多くの仮説が提出されている現状にすぎない。それらの説の中で現在もつとも有力なのは、コレステロール、トリグリセライド等の脂質代謝異常が主因として働き動脈硬化が発生するという説である。

ところでトリグリセライド代謝にリボプロテインリパーゼが重要な地位を占めていることは論をまたないが、動脈硬化を起こした高脂血症患者ではこのリパーゼの活性が低下していることが一般に認められている。したがつてこのリボプロテインリパーゼを活性化することは高脂血症の改善、ひいては動脈硬化の予防上きわめて意義のあることである。

従来からこの目的でヘパリンが臨床上使用されている。しかしこのヘパリンは強力な血液凝固阻止作用をも有するので、長期にわたり使用することができない上、高分子であるがために経口的に使用しても無効である。

本発明者は種々研究の結果、ペクチンを解重合したのち硫酸化させたところの平均重合度5〜20の低分子ペクチン硫酸が十分なりボプロテインリパーゼ活性化作用を有していること、ヘパリンに比べて無視しうる程の弱い血液凝固阻止作用しか持たないこと、そして消化管からの吸収も良好であることを発見した。この低分子ペクチン硫酸は、長期連続投与の可能な高脂血症治療剤として重要な価値を有している。

従来、ペクチンを低分子化する方法として次の3種の方法が知られている。すなわち(1)酸による加水分解、(2)中性ないしはアルカリ域に於けるトランスエリミネーションを伴う解重合、及び(3)過酸化水素等の過酸化物を単独ないしはこれにアルコリン酸等の還元剤もしくは Fe^{++} ・ Cu^{++} 等の存在の下に解重合を行なうOR D反応(Oxidative-Reductive Depolymerization)の三つである。

一般にウロニド結合は酸に対して安定であるため、ポリガラクトチュロン酸を主構成成分とするペクチンは酸による加水分解を受けにくい。したがつて(1)の方法による低分子化はあまり有利な方法とはいえない。その逆に(3)すなわちOR D反応によるペクチンの解重合は、その反応があまりにも良

3

く進行するため目的にかなった分子量の低分子ペクチンを得るためには、試薬及び反応条件等をかなり厳密に規定しなければならず、工業上必ずしも有利とはいえない。

また(2)の方法、すなわち中性ないしはアルカリ 5 域に於るペクチンのトランスエリミネーションを伴う解重合については、ペクチンの主構成成分であるポリガラクトユロン酸メチルエステルのエステル化度がその反応の進行に大きな影響を与えることが知られている。即ちそのエステル化度の大き 10 い程解重合はよく進行する。そして目的とする低分子ペクチン(平均重合度 5~20)をこの(2)の反応で得るためには高エステル化ペクチンを用いることが望ましいが、市販ペクチンを高エステル化して用いることは工業の見地から、あまり有利 15 とはいえない。

本発明者は高エステル化ペクチンを用いなくとも、市販ペクチンをメタノール、エタノール、グリセリン等を含有した高温のアルカリ溶液中で処理すれば、目的とする平均重合度 5~20 の低分子ペクチンが容易に得られることを発見した。

即ち上記アルコール類の添加により解重合はより有利に進行するのである。本発明はこの知見にもとづいて完成されたものである。

このアルコール類添加の効果を表 1~表 3 に示 25 す。

ここで用いられた実験法は後に実施例中で詳述する。

表 1

メタノール濃度	平均重合度
0%	14.1
20	10.4
40	8.7
60	9.2

ペクチン濃度 2.5 %
NaOH 0.25 %
反応時間 60分
温度 60℃

4

表 2

エタノール濃度	平均重合度
0%	9.2
10	8.7
20	7.8
40	7.1

ペクチン濃度 2.5 %
NaOH 0.25 %
反応時間 60分
温度 80℃

表 3

グリセリン濃度	平均重合度
0%	6.9
20	6.5
40	6.2

ペクチン濃度 2.5 %
NaOH 0.25 %
反応時間 60分
温度 100℃

30

アルコール類を添加するとこのように有利に解重合が進行するのは、添加したアルコールが脱メチル化を抑制するため高メチルエステルペクチンを原料とした場合と同様、トランスエリミネーシ 35 ョンを伴う解重合が円滑に進行するものと考えられる。

さて本発明方法をさらに詳しく説明すると次のようである。すなわち 10~60%のメタノール、エタノール、グリセリン等を含有する水溶液に、 40 添加しようとするペクチンが含有するカルボン酸に対しほぼ当量の苛性ソーダないしは苛性カリを加える。この量はペクチン重量の 1/20~1/4 程度である。次にペクチンを添加するがその濃度は 2~10%が適当である。

5

6

次いでこの混合物を加温又は加熱するが、その温度は40℃から溶液の沸騰する温度である。

耐圧容器を用いる場合には常圧下の沸点よりもさらに高温を使用できる。

反応時間は採用した温度及びその他の条件によつて異なるが、至適アルコール濃度及び温度では数十分以内の反応は終了する。

反応の終了は、溶液のpHが12~13という高アルカリから反応の進行に伴い中性付近まで低下して一定となることで知ることができる。

反応溶液に加えるアルコールはあまりに高濃度であるとペクチンが溶解しない。そのためかえつて反応が妨げられる。

ペクチン濃度によつて至適アルコール濃度も変化するが、通常10~40%が適当である。

添加するアルカリ量がペクチンのカルボン酸に対して当量よりあまりに過剰であると、ペクチンの分解が著しく進行し反応生成物は着色しかつ収量が低下する。またアルカリ量が当量よりあまりに過少であると、pHが中性以下となりもはや20トランスエリミネーションが起こらず、解重合がその時点で終るため好ましくない。

反応液のpHは反応終了時に中性付近になつて

※いるので、ふつう中和の必要はないが、必要に応じては中和を行なつてもよい。

反応終了液から目的とする重合度のペクチンを得るには、通常の塩析、溶媒分別沈殿法を組合せて行なえばよい。例えば食塩の存在下にメタノールを添加してゆくと、重合度の大きいものから順次低分子ペクチンが沈殿してくるので、これを遠心分離して集める。えられる沈殿はメタノールで洗浄し、アセトンで脱水したのちエーテルで乾燥10する。このようにして平均重合度5~20の低分子ペクチンを得ることができる。

次いで行なわれる硫酸化は、前記のようにして得られた低分子ペクチンをジメチルホルムアミド、ホルムアミド、ピリジン等の塩基性溶媒中でそれ15自体公知の硫酸化剤を用いて行なわれる。

このようにして得られた低分子ペクチン硫酸のリボプロテインリパーゼ活性化作用、及びプロトンピンタイムに与える影響をヘパリンと比較して表4に示す。低分子ペクチン硫酸は、その重合度及びS含量によつて生物活性は異なるがリボプロテインリパーゼ活性化作用がヘパリンの10~90%であるのに比べて、プロトンピンタイムに与える影響が100分の1以下である。

表 4

平均重合度	S%	LPL活性 ¹⁾	P.R ²⁾
19.5	13.6	1.358±0.130	2.01
14.8	13.5	1.289±0.126	1.93
11.9	13.5	1.160±0.127	1.74
8.7	13.4	0.942±0.061	1.66
5.3	13.4	0.388±0.074	1.66
10.4	13.4	1.478±0.135	1.87
10.4	9.9	0.240±0.070	1.08
10.4	3.1	0.098±0.028	0.85
ヘパリン		1.441±0.102	2.06※
食塩水		0.055±0.014	1.00

注1) リボプロテイン活性(LPL活性)

単位: FFA μ mole / 0.1 ml serum / 30 min

1群5匹のラットに薬物を2.5 mg/kg 静注し30分後の血中LPL活性を測定する。被検血清0.1 mlを基質を含んだ緩衝液に加え37℃で30分間反応させ生成する遊離脂肪酸(FFA)を測定し薬物投与前との差をLPL活性とする。

注2) P・Rとは薬物添加プラズマのプロトロンビンタイムをコントロールのプロトロンビンタイムで除した値である。なお薬物濃度は2.5 mg/ml (※ヘパリンは0.025 mg/ml)

次に図1の消化管吸収のデータについて説明する。この実験はラットを開腹し、十二指腸上部及び盲腸上部にカニキュレを挿入して薬物を500 mg/kg 注入し経時的にLPL活性を測定することによつて行なつたものである。

次に本発明の低分子ペクチン硫酸の毒性はマウス静脈投与LD₅₀の値で示すと次のようである。

平均重合度 5.3 S含量 13.4%のもので

重合度 10.4 S 13.4%のもので 20 2720 mg/kg
2050 mg/kg

重合度 19.5 S 13.6%のもので
1377 mg/kg

実施例 1

160 mlの水にメタノール40 ml苛性ソーダ0.5 gを加え、60℃に加温する。この溶液に市販ペクチン5.0 gを加え温度60℃で1時間攪拌する。反応液に5 M食塩水を2.2 ml加え(終濃度0.5 M)さらにメタノールを1600 mlを加える(終濃度90%)。生じた沈殿を速心分離して集めメタノールで洗滌しアセトンにて脱水し、エーテルで乾燥する。

収量 4.2 g (84%) 平均重合度 10.4

次に、このようにして得られた低分子ペクチンの硫酸化を行なう。すなわちホルムアミド30 ml 35を0℃に冷却し、クロルスルホン酸3 mlを混合し前記低分子ペクチンを3 g加えて室温で24時間攪拌する。反応液に5 M食塩水を終濃度0.5 Mになるよう加え、さらにメタノールを終濃度90%となるよう加え、生ずる沈殿を速心分離で集め、メタノールで洗滌しアセトンで脱水しエーテルで乾燥する。

次に少量の水に溶解し苛性ソーダで中和してNa塩となしメタノールを終濃度90%として生

ずる沈殿を集めアセトンで脱水しエーテルで乾燥する。

収量 4.7 g (157%) S含量 13.4%

実施例 2

180 mlの水にエタノール20 ml苛性ソーダ0.5 gを加え80℃に加温する。この溶液に市販ペクチン5.0 gを加え温度80℃で1時間攪拌する。

反応液に5 M食塩水を2.2 ml加え(終濃度0.5 M)さらにメタノール1800 ml加える(エタノール+メタノールのアルコール終濃度90%)。

生じた沈殿は実施例1と同様にして集める。

収量 3.8 g (76%) 平均重合度 8.7

硫酸化は実施例1と同様にして行なう。

収量 4.4 g (147%) S含量 13.4%

実施例 3

120 mlの水にグリセリン80 ml苛性ソーダ0.5 gを加え100℃に加温する。この溶液にペクチン5.0 gを加え温度100℃で1時間攪拌する。以下の処理法は実施例1, 2と同様にして行なう。

収量 4.3 g (86%) 平均重合度 6.2

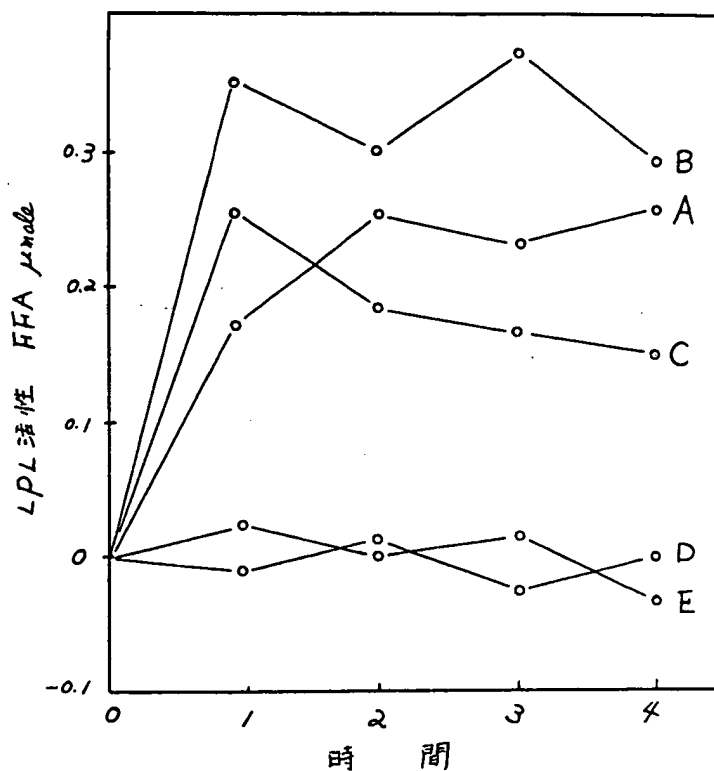
硫酸化は実施例1, 2と同様にして行なう。

収量 3.2 g (107%) S含量 13.4%

⑦特許請求の範囲

1 市販ペクチンを、その含有するカルボン酸に対してほぼ当量のアルカリを含む10~60%の低級アルコール又はグリセリン水溶液に加え、この混合物を温度40℃から溶液の沸騰する温度の範囲で解重合を行なつて平均重合度5~20の低分子ペクチンを得、次いでこれを常法により硫酸化することを特徴とする低分子ペクチン硫酸の製造法。

第 1 図



A: 平均重合度 19.5 S 13.6 %

B: " 10.4 S 13.4 %

C: " 5.3 S 13.4 %

D: ヘパリン

E: 生理食塩水